

احیای زیستی کرومات توسط پلی ساکاریدهای برون سلولی سودوموناس آئروژینوزا و ارتباط آن با مقاومت آنتی بیوتیکی

میترا عطاآبادی^{۱*}، آرزو طهمورث پور^۲، مهران هودجی^۱، محمود کلباسی^۱، مجید عبدوس^۳

^۱گروه خاکشناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اصفهان (خوراسگان)، اصفهان، ایران؛ ^۲گروه علوم پایه پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اصفهان (خوراسگان)،

اصفهان، ایران؛ ^۳گروه شیمی، دانشگاه امیرکبیر، تهران، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۲/۷/۱۳ تاریخ پذیرش: ۹۳/۵/۵

چکیده:

زمینه و هدف: کروم شش ظرفیتی (VI) یکی از اکسیدکننده های بسیار قوی و جز عناصر سرطان زای گروه A است که در پساب صنایع مختلف وجود دارد. اگرچه پلی ساکاریدهای (EPS) ترشح شده توسط باکتری های موجود در این پساب ها می تواند نقش موثری در افزایش مقاومت باکتری ها به این عامل نامساعد ایفا نماید. این تحقیق با هدف بررسی نقش EPS باکتری های مقاوم به کرومات در احیای کروم VI و مقاومت آنتی بیوتیکی آن ها صورت گرفته است.

روش بررسی: این مطالعه مقطعی- آزمایشگاهی بر روی باکتری های مقاوم به کرومات موجود در انواع مختلف پساب صورت گرفت. حداکثر غلظت قابل تحمل کرومات (MTC)، مقدار ترشح EPS، احیای کرومات توسط EPS و مقاومت آنتی بیوتیکی جدایه انتخابی به روش کیربی- بائر تعیین گردید.

یافته ها: جدایه موثر که واجد بالاترین MTC (۱۲۸ mM) و حداکثر توان ترشح EPS (0.117 mg.ml^{-1}) بود، بر اساس نتایج تست های بیوشیمیایی گونه ای از سودوموناس آئروژینوزا تشخیص داده شد. مقایسه راندمان ۶۱ درصدی احیای کرومات توسط EPS با راندمان ۷۸ درصدی احیای سلولی کرومات حاکی از نقش قابل توجه EPS در احیای کرومات بود. این باکتری به طیف وسیعی از آنتی بیوتیک ها نیز مقاومت نشان داد.

نتیجه گیری: افزایش کروم VI در محیط منجر به افزایش مقاومت باکتری ها با به کارگیری انواع مکانیسم های سازشی چون افزایش ترشح EPS می گردد و به موازات آن مقاومت آنتی بیوتیکی نیز افزایش می یابد. این مقاومت توأم از لحاظ پزشکی بسیار مهم بوده و می تواند اطلاعات ارزشمندی در ارتباط با مکانیسم مقاومت آنتی بیوتیکی، ژنتیک پلاسמיד و اکولوژی جدایه مورد نظر در اختیار ما قرار دهد.

واژه های کلیدی: آگزو پلی ساکارید، سودوموناس آئروژینوزا، کروم VI، آنتی بیوتیک، پساب.

مقدمه:

حضور دارد که این دو گونه از نظر سمیت و تحرک با یکدیگر کاملاً متفاوتند. گونه سه ظرفیتی کروم انحلال پذیری و تحرک کمی داشته و به راحتی در معرض جذب به وسیله موجودات زنده قرار نمی گیرد (۱)؛ حتی وجود غلظت مناسبی از این گونه کروم از نظر تغذیه ای برای انسان ضروری شناخته شده است. این در حالی است که کروم شش ظرفیتی از نظر ترمودینامیکی پایدار بوده و غالباً به صورت اکسی آنیون CrO_4^{2-} در آب، به ویژه آب های آلوده

کروم از عناصر فلزی است که به دلیل اهمیت اقتصادی، به طور گسترده ای در صنایع مختلف از جمله تهیه آلیاژهای کرومی، آبکاری کروم، ترکیبات بازدارنده خوردگی، تهیه رنگ، نساجی، صنایع چوب، دباغی و ساخت اجزای ماشین و هواپیما به کار رفته و ورود آن به محیط زیست از طریق پساب این صنایع و متعاقباً آلودگی خاک، رسوبات و آب های سطحی و زیرزمینی اجتناب ناپذیر است. کروم به دو شکل شش ظرفیتی (VI) و سه ظرفیتی (III) در سیستم های آبی

حضور دارد. انحلال پذیری، تحرک و پتانسیل اکسایش بالای این گونه از کروم، آن را به ترکیبی بسیار سمی و خطرناک برای سیستم های بیولوژیکی تبدیل نموده است. تجمع کروم باعث ایجاد اختلال در عملکرد کبد، کلیه و ریه می گردد (۲). به طوری که بر اساس اطلاعات آژانس حفاظت محیط زیست آمریکا (USEPA)، کروم VI به دلیل اثرات مزمن جز عناصر سرطان زای گروه A طبقه بندی شده است (۳). بر این اساس یافتن روش هایی موثر برای حذف این آلاینده از آب های آلوده که بازده بالایی نیز به همراه داشته باشند، امری مهم و ضروری است.

روش های مختلفی برای حذف کروم VI از محیط های آبی ارائه شده است که از آن جمله می توان به رسوب شیمیایی، رزین های تعویض یونی و جداسازی غشایی اشاره نمود (۲). گرچه این روش ها به طور گسترده ای مورد استفاده قرار گرفته اند؛ اما هزینه های بالای اجرا و کنترل بقایا، حجم زیاد مواد مصرفی و لجن تولید شده در نتیجه استقرار آن ها تا حدودی کاربرد برخی از این روش ها را محدود نموده است. بنابراین دسترسی به روش هایی موثرتر و کارآمدتر جهت حذف کروم VI از پساب های صنعتی مورد نیاز است. از این رو پژوهشگران به تکنولوژی سبز روی آوردند که پاکسازی زیستی قسمتی از این تکنولوژی را در بر می گیرد و مبتنی بر جداسازی و شناسایی میکروارگانیسم های مقاوم برای کاهش کارآمد و کم هزینه سمیت پساب های صنعتی است. انواع مختلفی از میکروارگانیسم ها از جمله باکتری ها، مخمرها، جلبک ها، پروتوزوآها و قارچ ها در پساب های حاوی کروم یافت شده اند که به روش های مختلفی شامل جذب زیستی، متیلاسیون و احیا از خود در مقابل اثرات سمی کروم VI محافظت می کنند که از بین مکانیسم های اشاره شده، احیا از موثرترین و کارآمدترین فرآیندهاست (۴). بنابراین عمده تلاش ها برای پالایش کروم VI از محیط های آلوده بر احیای این گونه از کروم به فرم سه ظرفیتی که با کاهش

تحرک و انحلال پذیری این عنصر همراه است، تمرکز یافته است (۵). بر این اساس شمار زیادی از باکتری های مقاوم به کروم با تغییر فرم محلول به نامحلول از پساب صنایع مرتبط با کروم جدا شده اند که از آن جمله می توان به گونه هایی از سودوموناس، میکروباکتریوم، دسولفوویبریو، انتروباکتر، اشرشیا، شوانلا، باسیلوس و اسینتوباکتر اشاره نمود (۶).

غالباً بر هم کنش باکتری ها با فلزات سنگین در محیط در قالب ساختار بیوفیلم متشکل از پلی ساکاریدهای برون سلولی (EPSs= exopolysaccharides) است (۷). EPS عموماً شامل ترکیباتی با وزن مولکولی بالا چون انواع کربوهیدرات ها، پروتئین و DNA بوده (۹) و امکان نگهداری عناصر غذایی و آب، اتصال باکتری ها به سطوح و محافظت سلول های پلانکتونیک در برابر تجزیه شیمیایی و عوامل نامساعد محیطی را تسهیل می نمایند (۸-۱۰) این مواد به دلیل وجود گروه های عامل باردار در ساختار خود، خصوصیات جذبی و دگرچسبی قابل توجهی دارند و به همین دلیل امکان جذب انواع مولکول های باردار مانند فلزات در سطح این مواد فراهم گردیده و موجبات تثبیت کوتاه مدت یا توقف بلند مدت آن ها را در محیط فراهم می آورند (۱۱،۱۰).

از این رو پلی ساکاریدهای برون سلولی نقش مهمی را در قالب جاذب های زیستی در پالایش فلزات ایفا می نمایند. به طوری که نتایج تحقیقات انجام شده حاکی از پالایش موثر سرب، نیکل و کادمیوم از پساب آلوده به این فلزات به واسطه به دام افتادن در ساختار این مواد است. وجود گروه های عاملی چون هیدروکسیل، کربوکسیل، فنول و سولفیدریل در ساختار پلی ساکاریدهای برون سلولی، جذب آلاینده های آنیونی چون کرومات را نیز تسهیل می نماید. شدت برهمکنش این مواد با اکسی آنیون کروم VI به فراوانی و ترکیب شیمیایی EPS و بنابراین به گونه باکتری و شرایط تغذیه ای آن وابسته است. تحقیقات نشان داده است که حضور کروم منجر به افزایش تولید پلی ساکاریدهای

برون سلولی و تغییر مرفولوژی بیوفيلم باکتری های احیا کننده سولفات می گردد (۱۲، ۱۳).

مسأله نگران کننده در این خصوص، ارتباط موجود بین مقاومت به فلزات سنگین و مقاومت آنتی بیوتیکی در باکتری هاست. وجود این مقاومت ها در باکتری ها یک پدیده محیطی انتخاب طبیعی برای بقای باکتری است که خطر انتقال این مقاومت ها به جوامع انسانی را افزایش می دهد (۱۴). هنگامی که چندین عامل ضد میکروبی به یک هدف مشترک حمله می کنند، پاسخ به این عوامل می تواند به طور همزمان صورت گیرد که این پاسخ تحت عنوان مقاومت همزمان نامگذاری شده است. برای مثال بررسی پلاسمیدهایی که منشأ آن ها از تأسیسات تیمار فاضلاب بوده، نشان داده است که این پلاسمیدها دارای ژن های مقاومت به جیوه، کرومات، تلوریت و چندین ژن مقاومت به آنتی بیوتیک هستند. آنالیز توالی نوکلئوتیدی نیز حاکی از آن بوده که عناصر ژنتیکی عامل مقاومت، یا در ناحیه ورود یا در ناحیه ترنسپوزون قرار گرفته اند که احتمالاً ضمن حوادث نو ترکیبی چندگانه، این مقاومت ها به پلاسمید افزوده شده اند و این مسأله از دیدگاه پزشکی بسیار حائز اهمیت است، چراکه گسترش این مورد در محیط می تواند تهدید جدی برای درمان موفقیت آمیز بیماری ها باشد (۶). از این رو این مطالعه با هدف بررسی نقش پلی ساکاریدهای برون سلولی باکتری های موجود در پساب آلوده به کرم در احیای کروم VI و تعیین مقاومت آنتی بیوتیکی جدایه انتخابی به منظور آگاهی از عوارض احتمالی آن بر سلامت جوامع انسانی صورت گرفته است.

روش بررسی:

این مطالعه مقطعی- آزمایشگاهی در آزمایشگاه پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد خوراسگان انجام شد. برای نمونه برداری از پساب و جداسازی باکتری های مقاوم به کروم VI، نمونه های پساب در بطری های

شیشه ای اسید شویی شده و استریل، جمع آوری گردیده و بر روی یخ به آزمایشگاه انتقال یافت. برای جداسازی باکتری های مقاوم به کرومات ابتدا محیط کشت Brain Heart Infusion (BHI) آگار استریل تهیه و ۰/۵ میلی مولار کروم VI (با استفاده از نمک $K_2Cr_2O_7$) به محیط کشت افزوده شد. سپس ۱ میلی لیتر از رقت های مختلف پساب (۱-۱۰ تا ۶-۱۰) به وسیله پیت استریل به سطح محیط کشت حاوی کروم VI افزوده و با میله شیشه ای سر کج بر سطح پلیت پخش گردید و پلیت ها به مدت ۳ تا ۷ روز در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد گرماگذاری شد. به منظور خالص سازی، کلنی های رشد یافته مجدداً به محیط BHI آگار حاوی کروم VI انتقال یافت و پس از حصول اطمینان از خالص شدن باکتری ها، حداکثر غلظت قابل تحمل (MTC= Maximum Tolerable Concentration) کروم VI برای هر جدایه در محیط BHI براث در حضور غلظت های مختلف کروم VI (۰/۵ تا ۲۰۰ میلی مولار) با استفاده از نمک $K_2Cr_2O_7$ تعیین گردید (۱۱).

برای انتخاب جدایه ای که قادر به تولید حداکثر پلی ساکارید برون سلولی است، در محیط کشت BHI براث از کشت ۲۴ ساعته هر جدایه سوسپانسیون ۰/۵ مک فارلند تهیه گردید. سپس ۵ میلی لیتر از این سوسپانسیون به ۱۰۰ میلی لیتر BHI براث انتقال یافته و با سرعت ۱۸۰ دور در دقیقه شیکر به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد گرماگذاری گردید. محیط کشت حاوی باکتری به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت $10000 \times g$ سانتریفیوژ شده، محلول صاف روئین جدا شده و با حجم معادل اتانول مخلوط شد. مخلوط حاصل به مدت ۱ شبانه روز در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری گردید تا پلی ساکاریدها رسوب نمایند. سپس مجدداً به مدت ۳۰ دقیقه با سرعت $10000 \times g$ سانتریفیوژ و رسوب ته نشین

شده جمع آوری گردید. رسوب حاصل دو بار با اتانول شسته شده و در نهایت مقدار EPS به روش فنل-اسید سولفوریک تعیین شد. برای تعیین مقدار EPS به این روش بایستی به ۲ میلی لیتر از عصاره بالا، ۱ میلی لیتر فنل ۵ درصد افزود و پس از آنکه مخلوط حاصل خوب به هم زده شد، ۵ میلی لیتر اسید سولفوریک غلیظ نیز به آن اضافه شود. حدود نیم ساعت پس از خنک شدن کامل محلول، جذب آن توسط اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۸۵ نانومتر اندازه گیری گردید (۱۵).

پس از انجام رنگ آمیزی گرم و تست های بیوشیمیایی، شناسایی جدایه های انتخابی بر طبق Bergey's manual of systematic bacteriology صورت گرفت. سپس منحنی رشد جدایه انتخاب شده در حضور غلظت های مختلفی از کروم VI شامل ۰ (کنترل)، ۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ میلی گرم در لیتر تعیین گردید. بدین منظور، به ارلن های حاوی ۱۰۰ میلی لیتر BHI براث که حاوی غلظت های مختلفی از کروم VI نیز بودند، ۱/۵×۱۰۸ سلول باکتری به عنوان مایه تلقیح اولیه اضافه گردید و رشد در طول موج ۶۰۰ نانومتر به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه گیری گردید (۱۵).

به منظور تعیین مقدار تولید پلی ساکاریدهای برون سلولی در حضور غلظت های مختلف کروم VI، جدایه انتخاب شده به ۱۰۰ میلی لیتر BHI براث حاوی غلظت های مختلف کروم VI (۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۱۰۰ میلی گرم در لیتر) تلقیح گردید، پلی ساکاریدهای برون سلولی پس از گذشت ۳ روز استخراج شده و سپس به روش فنل-اسید سولفوریک تعیین کمیت گردید. سینتیک تولید EPS در فواصل زمانی ۲ ساعته و در سه غلظت ۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ میلی گرم در لیتر کروم VI نیز مورد بررسی قرار گرفت و مقدار تولید به روش فنل-اسید سولفوریک اندازه گیری شد (۱۵).

جهت تعیین پتانسیل احیای کروم VI به وسیله جدایه انتخابی، یک لوپ پر از جدایه انتخابی به ۱۰۰ میلی لیتر BHI براث حاوی ۱۰ میلی گرم در لیتر کروم VI تلقیح گردید. ارلن ها به مدت ۲۴ ساعت و با سرعت ۱۸۰ دور در دقیقه در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد تکان داده شده و سپس

با سرعت ۱۰۰۰×g و به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. در محلول روئین حاصل از سانتریفیوژ غلظت کروم VI به روش دی فنیل کاربازید و با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر دو پرتویی تعیین گردید (۱۶). در مرحله بعد به منظور بررسی احیای کروم VI به وسیله آگزوبلی ساکاریدهای استخراج شده از جدایه انتخابی، یک لوپ پر از جدایه انتخابی به ۱۰۰ میلی لیتر BHI براث تلقیح شده و پس از گذشت ۱۸ ساعت از شروع گرماگذاری در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد (سرعت شیکر: ۱۸۰ دور در دقیقه)، یک نمونه ۲۰ میلی لیتری از آن برداشت گردید. پلی ساکاریدهای برون سلولی از این نمونه استخراج شده و در معرض ۱۰ میلی گرم در لیتر کروم VI قرار گرفت. در نهایت غلظت کل کروم با استفاده از دستگاه جذب اتمی (Perkin Elmer, Analyst 800) و غلظت کروم VI به روش رنگ سنجی دی فنیل کربازید اندازه گیری گردید (۱۶).

در نهایت برای بررسی مقاومت آنتی بیوتیکی جدایه انتخابی از دیسک های آنتی بیوتیکی شامل: جنتامایسین (GM10)، آمیکاسین (AN30)، نئومایسین (N30)، سفتریوکسیم (CT30)، سفالوتین (CF30)، سفنازیدیم (CFZ30)، سفکسیم (CFM5)، ونکومایسین (V30)، تتراسیکلین (TE30)، سیروفلوکساسین (CP5)، اریترومایسین (E15)، سولفامتوکسازول (SXT)، سفالکسین (CN30)، نیتروفرانتوئین (FM300)، نالیدیکسیک اسید (NA30)، کاربنی سیلین (CA100) و مروپنم (MEM30) تهیه شده از شرکت پادتن طب جهت آنتی بیوگرام استفاده شد و حساسیت باکتری سودوموناس آئروژینوزا به روش کیربی-بائر (Kirby-Bauer) بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار (MHA) در سه تکرار مورد سنجش قرار گرفت. در نهایت، قطر هاله عدم رشد با خط کش میلی متری اندازه گیری شد و با عناوین مقاوم، حساس و حد واسط گزارش گردید (۱۷). کلیه آزمایشات در سه تکرار صورت گرفت و داده ها به کمک آمار توصیفی با تعیین فاصله اطمینان توافقی و محاسبه خطای استاندارد توصیف گردید.

یافته ها:

باسیل گرم منفی است، بالاترین MTC را به خود اختصاص داده است. نتایج استخراج پلی ساکاریدهای برون سلولی نیز حاکی از تولید بیشترین اگزوپلی ساکارید به ترتیب توسط جدایه های ۱، ۲ و ۹ بوده است (جدول شماره ۱).

نتایج بررسی حداکثر غلظت قابل تحمل کروم VI و توان تولید پلی ساکاریدهای برون سلولی برای جدایه های مختلف در نشان داد؛ از ۱۰ بکتری جدا شده از پساب های مورد مطالعه، جدایه ۱ که گونه ای

جدول شماره ۱: حداکثر غلظت قابل تحمل و غلظت تولیدی اگزوپلی ساکاریدها توسط جدایه ها

جدایه	نوع باکتری	MTC (mM)	نوع پساب	محل نمونه برداری	میزان اگزوپلی ساکارید* (mg.ml ⁻¹)
۱	باسیل گرم منفی	۱۲۸	ذوب فلز	ذوب آهن اصفهان	۰/۱۱۷±۰/۰۳۸
۲	کوکسی گرم مثبت	۴۸	آبکاری	منطقه صنعتی دولت آباد	۰/۱۰۵±۰/۰۲۸
۳	کوکوباسیل گرم منفی	۶۴	فاضلاب شهری	دانشگاه آزاد خوراسگان	۰/۰۹۷±۰/۰۴۲
۴	باسیل گرم مثبت	۳۲	ذوب فلز	فولاد مبارکه اصفهان	۰/۰۸۵±۰/۰۲۹
۵	باسیل گرم مثبت	۳۲	ذوب فلز	فولاد مبارکه اصفهان	۰/۰۹۳±۰/۰۵۳
۶	باسیل گرم مثبت	۲۴	فاضلاب شهری	دانشگاه آزاد خوراسگان	۰/۰۸۷±۰/۰۳۵
۷	باسیل گرم مثبت	۲۸	فاضلاب شهری	دانشگاه آزاد خوراسگان	۰/۰۸۱±۰/۰۸۰
۸	باسیل گرم مثبت	۳۲	چرم سازی	چرمشهر ورامین	۰/۰۷۹±۰/۰۶۶
۹	باسیل گرم مثبت	۲۴	چرم سازی	چرمشهر ورامین	۰/۱۰۰±۰/۰۳۳
۱۰	باسیل گرم منفی	۲۰	فاضلاب شهری	دانشگاه آزاد خوراسگان	۰/۰۹۴±۰/۰۶۷

MTC = حداکثر غلظت قابل تحمل؛ * داده ها به صورت میانگین ± خطای استاندارد گزارش شده اند.

گرم، اقدام به انجام تست های بیوشیمیایی گردید؛ بر اساس نتایج بدست آمده جدایه موثر، سویه ای از سودوموناس آئروژینوزا تشخیص داده شد (جدول شماره ۲).

بنابراین جدایه موثر بر اساس نتایج به دست آمده از حداکثر غلظت قابل تحمل کروم VI و حداکثر توان تولید پلی ساکاریدهای برون سلولی انتخاب شد و برای شناسایی آن پس از تعیین واکنش

جدول شماره ۲: ویژگی های مورفولوژیک و بیوشیمیایی جدایه انتخابی

تست	نتیجه	تست	نتیجه	تست	نتیجه
مورفولوژی	باسیل	مانیتول	-	حرکت	+
واکنش گرم	-	سوکروز	-	تولید H ₂ S	-
تست KOH	+	فروکتوز	-	متیل رد	-
آرایش	منفرد	گالاکتوز	-	وژرپر سکوتر	-
پیگمان (بر روی آگار)	سبز آبی	احیای نیترات	+	هیدرولیز نشاسته	-
تولید اسید از قند	-	اوره آز	+	تولید گاز	-
گلوکز	-	اندول	-	کاتالاز	+
لاکتوز	-	سیترات	+	اکسیداز	+

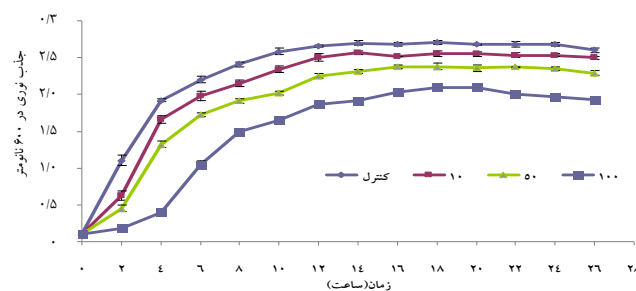
علامت (+): رشد و علامت (-): عدم رشد باکتری در محیط های مورد مطالعه را نشان می دهد.

گردید، با افزایش غلظت کروم VI در محیط، رشد باکتری کاهش یافته و شدت کاهش رشد کاملاً وابسته

در بررسی منحنی رشد سودوموناس آئروژینوزا در حضور غلظت های مختلف کروم VI مشخص

به غلظت کروم VI در محیط بوده است. به طوری که شیب رشد سودوموناس آئروژینوزا در حضور غلظت ۱۰ میلی گرم در لیتر کروم VI چندان تحت تأثیر قرار نگرفته، در حالی که با افزایش غلظت کروم VI، رشد متناسب با افزایش غلظت به شکل قابل توجهی کاهش یافته است. تفاوت در شیب اولیه منحنی رشد باکتری در حضور غلظت های مختلف کروم VI، احتمالاً به واسطه تفاوت در زمان مورد نیاز برای سازش باکتری با

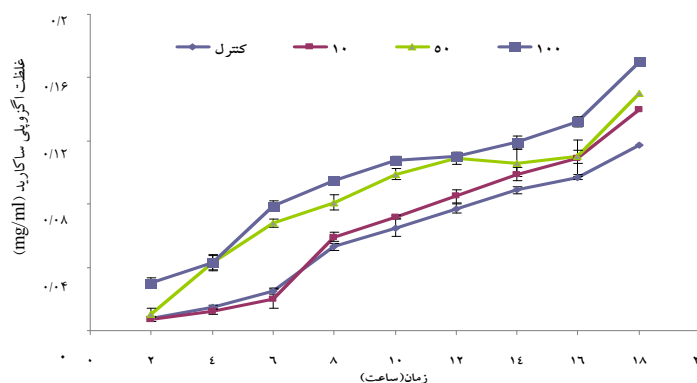
به غلظت های مختلف کروم VI بوده است. به طوری که شیب منحنی در غلظت های مختلف ۰، ۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ میلی گرم در لیتر کروم VI به ترتیب معادل ۰/۲۷/۵، ۰/۱۸/۰، ۰/۰۴ و ۰/۰۴ بوده است (نمودار شماره ۱). کاهش شیب اولیه منحنی به واسطه افزایش غلظت کروم VI احتمالاً حاکی از آن است که باکتری برای سازش با غلظت های بالاتر کروم به زمان بیشتری نیاز داشته است.



نمودار شماره ۱: منحنی رشد سودوموناس آئروژینوزا در حضور غلظت های مختلف کروم VI

نتایج بررسی تولید پلی ساکاریدهای برون سلولی در حضور غلظت های مختلف شامل ۰، ۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ میلی گرم در لیتر کروم VI نشان داد که افزایش غلظت کروم VI در محیط رشد باکتری، با افزایش تولید پلی ساکاریدهای برون سلولی همراه بوده است؛ به طوری که حداکثر مقدار EPS در غلظت ۱۰۰ میلی گرم در لیتر کروم و پس از ۱۸ ساعت از شروع رشد باکتری

صورت گرفته و معادل ۰/۱۷۱ میلی گرم در میلی لیتر بود. این در حالی است که حداکثر مقدار تولید EPS در غیاب کروم VI معادل ۰/۱۱۷ میلی گرم در میلی لیتر می باشد (نمودار شماره ۲). این نتایج حاکی از آن است که احتمالاً یکی از مکانیسم های افزایش سازگاری باکتری با کروم VI موجود در محیط، افزایش تولید پلی ساکاریدهای برون سلولی است.



نمودار شماره ۲: تولید پلی ساکاریدهای برون سلولی در فواصل زمانی ۲ ساعته در حضور غلظت های مختلف کروم VI

احیای کروم VI به وسیله باکتری ها از طریق مجموعه ای از مکانیسم های درون سلولی و برون سلولی صورت می گیرد. در این مطالعه برای بررسی نقش انحصاری پلی ساکاریدهای برون سلولی در احیای کرومات، پلی ساکاریدهای استخراج شده در معرض کروم VI قرار گرفت و نتایج به دست آمده با نتایج حاصل از بررسی احیای سلولی کروم VI به وسیله سودوموناس آئروژینوزا مقایسه گردید. غلظت کروم کل و کروم VI پس از گذشت ۳ روز به ترتیب معادل $8/70 \pm 0/731$ و $3/42 \pm 0/56$ میلی گرم در لیتر بود که گویای بازده ۶۱ درصدی احیای کرومات از طریق

پلی ساکاریدهای برون سلولی است. این در حالی است که راندمان احیای سلولی کرومات توسط باکتری سودوموناس آئروژینوزا معادل ۷۸ درصد بوده است. نتایج تست آنتی بیوگرام بر روی ایزوله سودوموناس آئروژینوزا نشان می دهد که جدایه انتخابی به آنتی بیوتیک های سفکسیم، سفنازیدیم، تتراسیکلین، اریترومايسين، سفالکسین، کاربنی سیلین، مروپنم و نالیدیکسیک اسید مقاوم بوده است که این موضوع می تواند بیانگر آن باشد که احتمالاً ژن های مقاومت به فلز و مقاومت به آنتی بیوتیک بر روی یک کروموزوم یا یک پلاسمید واقع شده اند (جدول شماره ۳).

جدول شماره ۳: الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی سودوموناس آئروژینوزا جدا شده از پساب آلوده به کرومات

آنتی بیوتیک	الگوی مقاومت	آنتی بیوتیک	الگوی مقاومت
جنتامایسین	حساس	سیپروفلوکساسین	حساس
آمیکاسین	حساس	اریترومايسين	مقاوم
سفتریوکسیم	حساس	سفالکسین	مقاوم
سفکسیم	مقاوم	کاربنی سیلین	مقاوم
سفنازیدیم	مقاوم	مروپنم	مقاوم
سولفومتوکسازول	نیمه حساس	نالیدیکسیک اسید	مقاوم
تتراسیکلین	مقاوم	نیتروفورانتوین	مقاوم

بحث:

پلی ساکاریدهای برون سلولی با ایجاد یک لایه حفاظتی در مقابل عوامل ضد باکتریایی و مضر در شرایط نامساعد، امکان جذب یون های آلی و غیر آلی را از محیط فراهم می آورند. در حقیقت ترشح این مواد توسط باکتری ها به محیط پیرامون خود از تماس مستقیم آلاینده با باکتری ممانعت به عمل آورده و امکان مقاومت و بقای بیشتر باکتری را فراهم می آورد. بنابراین حضور کروم VI در محیط به عنوان فلزی سمی و خطرناک، منجر به تحریک ترشح پلی ساکاریدهای برون سلولی توسط باکتری ها گردیده، سازگاری و مقاومت آن ها را افزایش می دهد. بنابراین این تحقیق با هدف بررسی

نقش پلی ساکاریدهای برون سلولی در احیای کرومات و ایجاد مقاومت آنتی بیوتیکی باکتری مقاوم به کروم VI طراحی گردید؛ از این رو پس از بررسی MTC و پتانسیل تولید پلی ساکاریدهای برون سلولی ۱۰ باکتری جدا شده از پساب های صنعتی، جدایه ۱ به دلیل داشتن بالاترین MTC (۱۲۸ میلی مولار) و حداکثر توان تولید EPS (۰/۱۱۷ میلی گرم در میلی لیتر) به عنوان جدایه موثر انتخاب گردید که بر اساس نتایج تست های بیوشیمیایی گونه ای از سودوموناس آئروژینوزا تشخیص داده شد. در مطالعات صورت گرفته آستانه تحمل کروم VI برای انواع باکتری های موجود در پساب های حاوی

کروم بسیار متفاوت و به عنوان نمونه شامل ۱۲ میلی مولار برای باکتری *Pseudomonas aeruginosa* (۱۸)، ۱۹ میلی مولار برای *Enterobacter cloacae* SUKCr1D (۱۵)، ۷۶۰ میلی مولار برای *Staphylococcus R1-7A* (۶)، ۲۲ میلی مولار برای باکتری *arlettae* (۶) و *Corynebacterium hoagie* (۱۹) گزارش شده است. اکثر باکتری ها قادر به تولید EPS در محیط پیرامون خود هستند و این توانایی امکان اتصال، تحمل و احیای کروم به وسیله آن ها را افزایش می دهد (۲۱، ۲۰). در این تحقیق افزایش تولید EPS به موازات افزایش کروم VI در محیط رشد باکتری، موید وجود این مکانیسم سازگاری در باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* است. به طوری که حداکثر ترشح EPS توسط این باکتری در غلظت ۱۰۰ میلی گرم در لیتر کروم VI و معادل ۰/۱۷۱ میلی گرم در میلی لیتر بوده است که در مقایسه با شرایط عدم حضور کروم VI در محیط (شرایط کنترل)، ۴۶ درصد افزایش نشان داده است و تقریباً ۲/۲ برابر EPS گزارش شده در شرایط مشابه توسط باکتری *Enterobacter cloacae* در مطالعه Harish و همکاران بوده است (۱۵).

در نتایج تحقیقات اخیر توسط Sundar و همکاران نیز به تولید EPS توسط باکتری های مقاوم به کروم جدا شده از پساب صنایع چرم سازی با غلظتی در حدود ۰/۰۵۹ تا ۰/۰۶۳ میلی گرم در میلی لیتر اشاره شده است. این محققین نیز به افزایش تولید EPS توسط باکتری *Bacillus subtilis* در اثر افزایش غلظت کروم در محیط اشاره نموده اند (۲۲). در مطالعه دیگری پیرامون جذب زیستی کروم VI بر روی کرین فعال، گزارش شده است که سه باکتری (*Bacillus* *Streptococcus equisimilis coagulans* (CECT12 (CECT 926) و *Escherichia coli* (CECT 515) به ترتیب قادر به تولید ۹/۱۹، ۷/۲۴ و ۴/۷۷ میلی گرم پلی ساکارید در هر گرم زیست جاذب بوده اند (۲۳).

مقایسه راندمان ۶۱ درصدی احیای کرومات از طریق EPS با بازده ۷۸ درصدی احیای سلولی کرومات حاکی از دخالت فرآیندهای وابسته به سلول در احیای زیستی کرومات است که از آن جمله می توان به نقش آنزیم احیا کننده کروم نیز اشاره نمود. مقایسه نتایج این تحقیق با نتایج محققین دیگر که احیای کرومات از طریق EPS و احیای سلولی کرومات را به ترتیب ۳۱/۷ و ۷۱/۹ درصد گزارش نموده اند، به نقش موثرتر احیای پلی ساکاریدی *Pseudomonas aeruginosa* در مطالعه حاضر در مقایسه با *Enterobacter cloacae* اشاره دارد (۱۵). در نتایج تحقیقات صورت گرفته، گزارش شده است که در اکثر سیستم های هوازی، آنزیم های کرومات ردوکتاز محلول در سیتوزول، مسئول احیای کروم VI به کروم III در درون سلول یا خارج از غشای پلاسمایی هستند. از جمله باکتری هایی که فرآیند احیای کرومات توسط آن ها عمدتاً از طریق سیستم آنزیمی صورت می گیرد، می توان به باکتری های *E. coli* و *Bacillus firmus* اشاره نمود (۲۴).

مقاومت آنتی بیوتیکی باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* به طیف وسیعی از آنتی بیوتیک ها در این مطالعه (سفکسیم، سفتازیدیم، تتراسیکلین، اریترومایسین، سفالکسین، کاربنی سیلین، مروپنم، نالیدیکسیک اسید، کاربنی سیلین و نیتروفورانتوئین) نیز احتمالاً ناشی از افزایش توان تحمل باکتری در محیط به واسطه پتانسیل بالای تولید EPS به عنوان مکانیسمی برای افزایش سازگاری و مقاومت در محیط است. گروهی از محققین نیز موفق به شناسایی چندین باکتری شامل *Pseudomonas aeruginosa*، *Staphylococcus epidermidis* و *Klebsiella pneumoniae* شدند که با تشکیل بیوفیلم نسبت به چندین آنتی بیوتیک و فلز سنگین از خود مقاومت نشان دادند (۱۹).

آئروژینوزا در حقیقت پاسخی به افزایش کرومات به عنوان یک عامل نامساعد محیطی و به کارگیری مکانیسمی جهت افزایش سازگاری و مقاومت باکتری است که نتیجه آن افزایش مقاومت این باکتری به طیف وسیعی از آنتی بیوتیک ها بوده است؛ زیرا ژن های مقاومت به فلز و مقاومت به آنتی بیوتیک عموماً بر روی یک پلاسمید یا اپرون در مجاورت یکدیگر قرار گرفته اند. بنابراین افزایش فلزات سنگین در محیط می تواند منجر به افزایش مقاومت باکتری ها گردد و علاوه بر پیامدهای زیست محیطی، مخاطراتی برای سلامتی انسان به دنبال داشته باشد.

تشکر و قدردانی:

بدین وسیله از سرکار خانم نفیسه قاسمی، کارشناس آزمایشگاه میکروبیولوژی و جناب آقای مهندس امینی رئیس محترم آزمایشگاه های دانشکده کشاورزی دانشگاه آزاد اسلامی واحد خوراسگان سپاسگزاری می گردد.

در مطالعات انجام شده، شواهدی مبنی بر وجود ارتباط بین آلودگی فلزی محیط باکتری و گسترش مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک ها وجود دارد. ارتباط نوع و میزان فلزات آلوده کننده و الگوهای اختصاصی مقاومت آنتی بیوتیکی مبین سازوکارهای متعدد مقاومت توأم نسبت به آنتی بیوتیک ها و فلزات سنگین می باشد و می توان نتیجه گیری نمود که احتمالاً ژن های مسئول ایجاد مقاومت نسبت به هر دو عامل خارجی یکسان هستند. پاسخ های غیر مستقیم باکتری به فلزات و آنتی بیوتیک ها از قبیل تولید EPS نیز مبین این مطلب است (۲۵).

نتیجه گیری:

نتایج این تحقیق نشان داد که EPS به تنهایی و بدون دخالت فرآیندهای سلولی- آنزیمی نقش موثر و کارآمدی در احیای کرومات و کاهش سمیت پساب های صنعتی دارد. افزایش ترشح پلی ساکاریدهای برون سلولی توسط باکتری سودوموناس

منابع:

1. Papassiopi N, Kontoyianni A, Vaxevanidou K, Xenidis A. Assessment of chromium biostabilization in contaminated soils using standard leaching and sequential extraction techniques. *Sci Total Environ*. 2009; 407(2): 925-36.
2. Khodabakhshi A, Amin MM, Sedehi M. Removal of Cr (VI) from simulated electroplating wastewater by magnetite nanoparticles. *J Shahrekord Univ Med Sci*. 2011; 13(4): 94-101.
3. Rahmani AR, Norozi R, Samadi MT, Afkhami A. Hexavalent chromium removal from aqueous solution by produced Iron nanoparticles. *Iran J Environ Health*. 2009; 1(2): 67-74.
4. Faryal R, Yusuf M, Munir K, Faheem T, Abdul hameed. Enhancement of Cr⁶⁺ Removal by *Aspergillus Niger* RH19 Using a Biofermenter. *Pak J Bot*. 2007; 39(5):1873-81.
5. Cook, KR. In situ treatment of soil and groundwater contaminated with chromium: technical resource guide. Washington: Center for Environmental Research Information, Office of Research and Development; 2000.
6. Zolfaghary MR, Soleymani Darjagh M, Masoudikhah M, Khodadadmotlagh M, Heydarpour A. The Frequency and Antibiotic Resistance of Chromate Tolerating Microorganisms in Qom Industrial wastewater. *Qom Univ Med Sci J*. 2012; 6(2):15-23.
7. Davey ME, O'Toole GA. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2000; 64(4):847-67.
8. Sutherland IW. Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology*. 2001; 147(1): 1-9.
9. Blenkinsopp SA, Costerton JW. Understanding bacterial biofilms. *Trends Biotechnol*. 1991; 9(1):138-43.

10. Chen JH, Lion LW, Ghiorse WC, Shuler ML. Mobilization of adsorbed cadmium and lead in aquifer material by bacterial extracellular polymers. *Water Res.* 1995; 29(2):421–30.
11. Teitzel GM, Parsek MR. Heavy metal resistance of biofilm and planktonic *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol.* 2003; 69(4): 2313–20.
12. Sethuraman P, Balasubramanian N. Removal of Cr (VI) from aqueous solution using *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterobacter cloacae*. *Int J Eng Sci Tech.* 2010; 2(6): 1811–25.
13. Priester JH, Olson SJ, Webb SM, Neu MP, Hersman LE, Holden PA. Enhanced exopolymer production and chromium stabilization in *pseudomonas putida* unsaturated biofilms. *Appl Environ Microbiol.* 2006 ; 72(3):1988-96.
14. Pathak SP, Gopal K. Occurrence of antibiotic and metal resistance in bacteria from organs of river fish. *Environ Res.* 2005; 98(1): 100-103.
15. Harish R, Samuel J, Mishra R, Chandrasekaran N, Mukherjee A. Bio-reduction of Cr(VI) by exopolysaccharides (EPS) from indigenous bacterial species of Sukinda chromite mine, India. *Biodegradation.* 2012 Jul; 23(4): 487-96.
16. American Public Health Association, American water works Association. Standard methods for the examination of water and wastewater. Washington: Amer Public Health Assn (APHA) Pub; 2005.
17. Baure AW, Kirby WM, Sherris JC, Truck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. *Am J Clin Pathol.* 1966; 45(4): 403-6.
18. Oyetibo GO, Ilori MO, Adebuseye SA, Obayori OS, Amund OO. Bacteria with dual resistance to elevated concentrations of heavy metals and antibiotics in Nigerian contaminated systems. *Environ Monit Assess.* 2010; 168(1-4):305–14.
19. Loo CY, Mitrakul K, Voss IB, Hughes CV, Ganeshkumar N. Involvement of the *adc* operon and manganese homeostasis in *streptococcus gordonii* biofilm formation. *J Bacteriol* 2003; 185(9):2887-2900.
20. Ozturk S, Aslim B. Relationship between chromium (VI) resistance and extracellular polymeric substances (EPS) concentration by some cyanobacterial isolates. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2008; 15(6): 478-80.
21. Dupraz C, Reid PR, Braissant O, Decho AW, Norman SR, Visscher PT. Processes of carbonate precipitation in modern microbial mats. *Earth-Sci Rev.* 2009; 96(3): 141–62.
22. Sundar K, Mukherjee A, Sadiq M, Chandrasekaran N. Cr(III) bioremoval capacities of indigenous and adapted bacterial strains from Palar river basin. *J Hazard Mater.* 2011; 187(1-3): 553–61.
23. Quintelas C, Fernandes B, Castro J, Figueiredo H, Tavares T. Biosorption of Cr(VI) by three different bacterial species supported on granular activated carbon-A comparative study. *J Hazard Mater.* 2007; 153(1-2): 799–809.
24. Cheung KH, Ji-Dong Gu. Mechanism of hexavalent chromium detoxification by microorganisms and bioremediation application potential: a review. *Int Biodeter Biodegr.* 2007; 59(1):8–15.
25. Seiler C, Berendonk TU. Heavy metal driven co-selection of antibiotic resistance in soil and water bodies impacted by agriculture and aquaculture. *Front Microbiol.* 2012; 3(399): 1-10.

The role of exopolysaccharides from a chromate reducing *Pseudomonas aeruginosa* in resistance to hexavalent chromium and antibiotics

Ataabadi M^{1*}, Tahmourespour A², Hoodaji M¹, Kalbasi M¹, Abdous M³

¹Soil Sciences Dept., Islamic Azad University, Isfahan (Khorasgan) Branch, Isfahan, I.R. Iran;

²Basic Medical Sciences Dept., Islamic Azad University, Isfahan (Khorasgan) Branch, Isfahan, I.R. Iran; ³Chemistry Dept., Amirkabir University of Technology, Tehran, I.R. Iran.

Received: 5/Oct/2013

Accepted: 27/July/2014

Background and aims: Cr (VI) is one of the strongest oxidizing agents and is classified as carcinogen group A which presents in various industrial wastewaters. Exopolysaccharides (EPS) are natural polymers that are secreted from several environmental bacterial groups especially in response to adverse conditions. Therefore, exopolysaccharides from bacterial species of these wastewaters may contribute in increasing their resistance to unfavorable factors. Thus the aim of this study was to investigate the role of exopolysaccharides from chromate resistant bacteria in chromate reduction and antibiotic resistance.

Methods: This research was a laboratory cross-sectional study that was performed on chromate resistant bacterial species in different kinds of wastewaters. Maximum tolerable concentration (MTC), amount of exopolysaccharides secretion, chromate reduction by EPS and antibiotics resistance of selected isolation were determined. The data were analyzed by determining the standard error and agreed confidence intervals ($P < 0.05$).

Results: An effective isolation showed the highest MTC and EPS production: 128 mM and 0.117 mg.ml⁻¹ respectively was identified as *Pseudomonas aeruginosa* based on biochemical test results. Comparison between chromate reduction efficiency by EPS solely (61%) and chromate reduction efficiency by bacterial cell (78%) indicated considerable role of EPS in chromate reduction. These bacteria also indicated resistance to a wide range of antibiotics.

Conclusion: Environmental increasing of Cr(VI) concentration leads to increasing in bacterial resistance using various types of adaptable mechanisms such as higher EPS production. This resistance is very important in terms of a medicine subject and can be valuable information for us in the relationship to the mechanisms of antibiotic resistance, plasmid genetics and the desired isolated ecology.

Keywords: Exopolysaccharides, *Pseudomonas aeruginosa*, Hexavalent chromium, Antibiotic, Wastewater.

Cite this article as: Ataabadi M, Tahmourespour A, Hoodaji M, Kalbasi M, Abdous M. The role of exopolysaccharides from a chromate reducing *Pseudomonas aeruginosa* in resistance to hexavalent chromium and antibiotics. J Shahrekord Univ Med Sci. 2014; 16(4): 28-38.

*Corresponding author:

Soil Sciences Dept., Islamic Azad University, Isfahan (Khorasgan) Branch, Isfahan, I.R. Iran.
Tel: 00989131264722, E-mail: mitra_ataabadi@yahoo.com